

SKRIPSI

**PENGARUH ERYTHRITOL TERHADAP PERTUMBUHAN
BRUCELLA ABORTUS STRAIN 19 SECARA *IN VITRO***



OLEH :

SINTA PAWESTRI

MALANG - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
S U R A B A Y A
1997**

SKRIPSI

**PENGARUH ERYTHRITOL TERHADAP PERTUMBUHAN
BRUCELLA ABORTUS STRAIN 19 SECARA *IN VITRO***

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk menempuh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

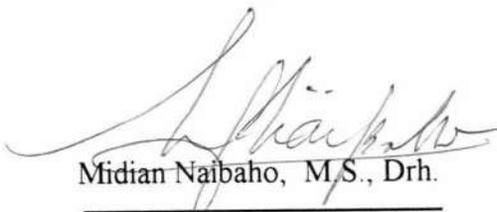
Oleh

SINTA PAWESTRI

069211907

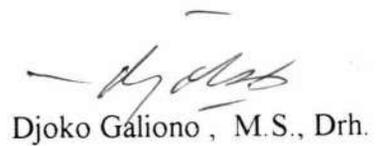
Menyetujui

Pembimbing



Midian Naibaho, M.S., Drh.

Pembimbing Pertama

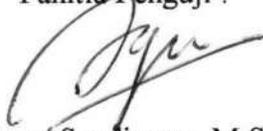


Djoko Galiono, M.S., Drh.

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar *Sarjana Kedokteran Hewan*.

Panitia Penguji :



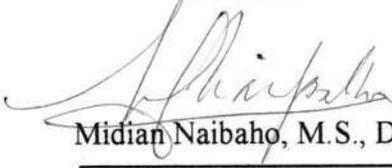
Dr. Sri Agus Soedjarwo, M.Sc., Drh.

Ketua



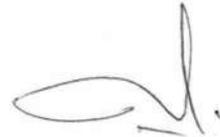
Didik Handijatno, M.S., Drh.

Sekretaris



Midian Naibaho, M.S., Drh.

Anggota



Budi Utomo, M.S., Drh.

Anggota



Djoko Galiono, M.S., Drh.

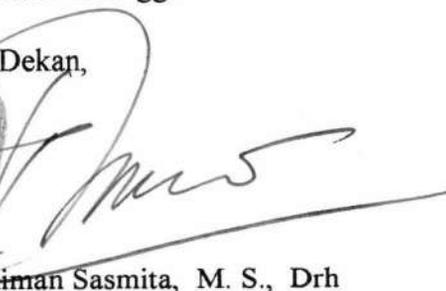
Anggota

Surabaya, 23 Desember 1997

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, M. S., Drh

NIP. 130 350 739

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang.....	1
I.2. Perumusan Masalah	4
I.3. Tujuan Penelitian	4
I.4. Landasan Teori	4
I.5. Hipotesis Penelitian	5
I.6. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1. Erythritol	6
II.1.1. Tinjauan sifat fisikokimia	6
II.2. Erythirol <i>In vivo</i>	7
II.3. Sejarah Penyakit Brucellosis.....	8
II.4. Keganasan dan Jalannya Penyakit.....	9
II.5. <i>Brucella abortus</i> Strain 19	10
II.5.1. Morfologi <i>Brucella abortus</i> Strain 19	10
II.5.2. Sifat pupukan <i>Brucella abortus</i>	10
II.5.3. Sifat biokimia <i>Brucella abortus</i>	11

	Halaman
II.5.4. Resistensi dan toleransi.....	10
II.6. Pertumbuhan Bakteri.....	13
II.6.1. Fisiologi pertumbuhan.....	13
II.6.2. Pertumbuhan <i>Brucella abortus</i> Strain 19.....	14
II.6.3. Kondisi fisik yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri.....	15
BAB III. MATERI DAN METODE.....	18
III.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
III.2. Materi Penelitian.....	19
III.2.1. Bahan penelitian.....	19
III.2.2. Alat penelitian.....	19
III.3. Metode Penelitian.....	20
III.3.1. Sterilisasi alat.....	20
III.3.2. Pembuatan larutan kentang.....	20
III.3.3. Pembuatan larutan erythritol.....	21
III.3.4. Pembuatan Medium Potato Agar.....	21
III.3.5. Pemiakan bakteri.....	23
III.3.6. Panen.....	23
III.3.7. Penghitungan jumlah koloni bakteri.....	24
III.4. Peubah.....	25
III.5. Analisis Data.....	25

	Halaman
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	26
BAB V. PEMBAHASAN	29
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	34
VI.1. Kesimpulan.....	34
VI.2. Saran.....	34
RINGKASAN.....	35
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan erythritol dalam jaringan fetus dan jaringan sapi dewasa (ppm).....	8
2. Rata-rata jumlah koloni <i>Brucella abortus</i> strain 19 (koloni per mililiter) pada hari keempat setelah pemupukan.....	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Urutan Kerja Penelitian	40
2. Menghitung Jumlah Bakteri dalam Satu Mililiter.....	41
3. Pembuatan bahan-bahan penelitian	43
4. Penghitungan statistik Analisis Varian dengan Uji F	44
5. Penghitungan statistik dengan Uji Jarak Duncan	46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Pembangunan di bidang peternakan perlu terus diperhatikan untuk pemenuhan kebutuhan pangan secara nasional seiring dengan semakin meningkatnya kebutuhan akan protein hewani. Usaha mempertinggi produktivitas ternak ditempuh melalui kebijaksanaan teknis yang diarahkan untuk meningkatkan jumlah kelahiran ternak, menekan angka kematian, pengendalian pemotongan ternak betina produktif dan mengendalikan ekspor serta mengimpor bibit ternak unggul untuk meningkatkan mutu genetik dan mutu ternak dalam negeri (Soehadji, 1993).

Peningkatan produktivitas ternak tidak dapat lepas dari daya reproduksi yang banyak ditentukan oleh faktor manajemen, genetis, gangguan fisiologis dan faktor penyakit. Salah satu penyakit yang mempengaruhi produksi dan reproduksi ternak ruminansia adalah brucellosis sapi. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Brucella abortus* yang mengakibatkan keguguran atau keluron menular pada umur kebuntingan 5-8 bulan. Smith *et al*, (1962) menyatakan bahwa keguguran yang terjadi disebabkan oleh perbanyakan bakteri pada cairan fetus yang distimulir oleh adanya zat tersifat yaitu erythritol. Kondisi pedet yang dilahirkan umumnya lemah

dan kemudian mati. Produksi susu induk menurun dan alat reproduksi terganggu sehingga mengakibatkan kemajiran temporer atau permanen, sedangkan pada hewan jantan dapat menyebabkan radang epididimis dan orchitis (Anonimus, 1980). Menurut perhitungan Direktorat Jenderal Peternakan, kerugian akibat brucellosis ditaksir sekitar 110 milyar per tahun dan penyakit ini dapat menular dari hewan kepada manusia sehingga brucellosis merupakan zoonosis yang penting (Anonimus, 1991).

Usaha membebaskan penyakit brucellosis pada sapi potong, sapi perah dan kerbau di pulau Jawa telah dilakukan oleh Direktorat Jenderal Peternakan yang menugaskan Balai Penyidikan Penyakit Hewan (BPPH) wilayah IV Yogyakarta untuk bekerja sama dengan Dinas Peternakan Daerah guna mengadakan pengamatan dan penyidikan dalam rangka memperoleh data dasar yang akan digunakan sebagai acuan untuk program pemberantasan penyakit brucellosis.

Satu-satunya cara mencegah wabah brucellosis adalah melalui program vaksinasi (Internet, 1997), karena hingga kini masih belum ada pengobatan yang efektif untuk penyakit brucellosis ini. Karena alasan ekonomis di atas, maka pencegahan wabah brucellosis merupakan jalan satu-satunya yang paling efektif. Sejalan dengan itu pada dua tahun terakhir ini pemerintah semakin giat menghimbau agar vaksinasi pada sapi muda harus segera dilakukan. Upaya mengimbangi hal

tersebut maka target produksi vaksin brucellosis semakin ditingkatkan dalam rangka program vaksinasi tersebut.

Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya sebagai satu-satunya unit pelaksana teknis di lingkungan Direktorat Jenderal Peternakan yang tugas utamanya memproduksi vaksin telah memulai penelitian dengan memproduksi vaksin Brucivet tahun 1978 dan mulai memproduksi vaksin ini pada tahun 1980. Sampai saat ini masih dirasakan perlu adanya pengembangan metode maupun penemuan-penemuan baru dalam rangka memenuhi kebutuhan vaksin yang semakin meningkat. Sebagai contoh, untuk produksi vaksin brucella telah dikembangkan cara-cara baru mulai dari modifikasi bahan untuk media biak, hingga mencoba mengganti media biak cair untuk tujuan efisiensi.

Sehubungan dengan hal tersebut di atas, maka penelitian ini mencoba mengetengahkan peranan erythritol dengan berbagai konsentrasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pertumbuhan *Brucella abortus*. Sperry and Robertson (1975) menyatakan bahwa erythritol telah banyak diteliti pada genus brucella.

Model antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brucella abortus* strain 19 yang diperoleh dari laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Bila erythritol benar-benar dapat merangsang pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19, maka akan ditandai dengan peningkatan jumlah koloni *Brucella*

abortus Strain 19 pada Medium Brucella Agar pada hari keempat setelah pemupukan pada medium tersebut, demikian pula sebaliknya.

1.2. Rumusan Masalah

Bertitik tolak dari latar belakang tersebut di atas, maka timbul permasalahan, apakah erythritol mempengaruhi pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 di dalam Medium Brucella Agar. Bila benar, pada erythritol konsentrasi berapakah dapat menyebabkan hal itu terjadi.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi pemberian erythritol di dalam Medium Potato Agar terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 ditinjau dari jumlah koloni yang tumbuh pada Medium Brucella Agar pada hari keempat setelah pemupukan.

1.4. Landasan Teori

Perbanyakkan bakteri *Brucella abortus* di dalam jaringan embrional dipermudah oleh adanya zat perangsang pertumbuhan tersifat yaitu erythritol yang terdapat dalam cairan korion, kotiledon maupun cairan fetus (Smith *et al.*, 1965).

1.5. Hipotesis Penelitian

Erythritol dengan berbagai konsentrasi di dalam Medium Potato Agar dapat mempengaruhi pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19, yang diamati pada pertumbuhan koloni pada hari keempat setelah pemupukan.

1.6. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat untuk mengetahui pengaruh erythritol yang sesungguhnya terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 di dalam Medium Potato Agar guna dijadikan sebagai bahan pertimbangan untuk tujuan produksi vaksin brucellosis yang menggunakan *Brucella abortus* Strain 19.

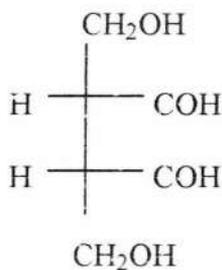
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1. Erythritol

2. 1. 1. Tinjauan sifat fisikokimia

Erythritol memiliki rumus bangun 1, 2, 3, 4 tetrahydroxybutane, sebagaimana tampak pada gambar dibawah ini :



Gambar 1. Rumus bangun Erythritol
(Sumber : Internet, 1997).

Erythritol yang mempunyai nama lain adalah *i*-erythritol, erythrol, phycitol, 1:2:3:4 tetrahydroxybutane maupun *meso*-erythritol ini mempunyai berat molekul 122,12 gram per mol (Anonimus, 1996). Kelarutan erythritol yang diketahui adalah sangat larut dalam air, dapat larut dalam pyridin, agak larut dalam alkohol serta tidak dapat larut dalam eter (Anonimus, 1989). Senyawa dengan kandungan karbon (C) sebanyak 39,34 %, hidrogen (H) 82,5 % dan oksigen (O) 52,41 % ini mempunyai titik leleh 329-331⁰ Celcius dan titik didih 121⁰ Celcius. Bentuk sediaan meso isomer yang dihasilkan secara sintetis adalah kristal dengan kemasan 5 gram dan 25 gram.

Erythritol juga bisa diperoleh melalui proses fraksinasi dan kristalisasi dari jaringan fetus (Smith *et al.*, 1962). Senyawa ini juga dapat diisolasi dari alga, sebangsa lumut dan rumput (Anonimus, 1989).

2. 2. Erythritol *In vivo*

Erythritol secara alami didapatkan pada jaringan fetus yaitu cairan allantois, chorion, kotiledon (plasenta), ginjal, paru-paru, hati dan limpa. Senyawa dengan rumus kimia $C_4H_{10}O_4$ ini lebih banyak ditemukan dalam jaringan fetus sapi bunting daripada dalam jaringan sapi dewasa (Smith *et al.*, 1962). Selanjutnya dikatakan pula olehnya bahwa pertumbuhan bakteri yang hebat pada kejadian abortus besar kemungkinan karena adanya suatu metabolit di dalam jaringan fetus yang secara spesifik merangsang pertumbuhan spesies tertentu saja, yaitu *Brucella abortus*.

Soebronto (1993) juga mengungkapkan bahwa bakteri mempunyai kemampuan tumbuh dengan baik dalam jaringan embrional karena uterus hewan bunting memiliki kondisi khusus sehingga perbanyak bakteri dipermudah oleh adanya zat perangsang pertumbuhan tersifat yaitu erythritol yang terdapat dalam cairan korion, kotiledon maupun cairan janin. Akibatnya uterus hewan bunting akan mengalami infeksi terus menerus oleh bakteri yang dibebaskan dari tempat koloni tetapnya dan berbiak dengan cepat sehingga hewan mengalami peradangan dan terjadi keguguran atau retensi plasenta. Sebaliknya bakteri tersebut tidak dapat berkembang biak dalam jaringan uterus yang tidak bunting (Ressang, 1984).

Tabel 1. Kandungan Erythritol dalam Jaringan Fetus dan Jaringan Sapi Dewasa

Lokasi Erythritol	Jaringan Fetus (ppm)	Jaringan Sapi Dewasa (ppm)
Cairan allantois	150	-
Korion	80	-
Kotiledon	50	30
Ginjal	25	<5
Paru-paru	16	<2
Hati	8	<2
Limpa	3	<3

Sumber : Smith *et al.*, (1962)

2.3. Sejarah Penyakit Brucellosis

Brucellosis adalah penyakit yang bersifat zoonosis yaitu penyakit yang dapat menular dari hewan ke manusia dan telah menyebar ke seluruh dunia terutama pada negara-negara yang penduduknya beternak sapi, kambing, domba atau babi dengan menyebabkan keguguran dan kemajiran (Ressang, 1984).

Bakteri penyebab brucellosis pertama kali diisolasi oleh Bruce pada tahun 1887 dari limpa kambing di Malta (Naibaho dan Ratih, 1982). Waktu itu dikenal dengan *Demam Malta* atau *Mediterranean Fever*, sedangkan bakteri penyebabnya diberi nama *Micrococcus melitensis*. Disebut *Micrococcus* karena bakteri yang ditemukan berbentuk batang kecil hampir menyerupai kokus dan *melitensis* sebab penyakit penderita setelah minum air susu domba. *Brucella* pada sapi diisolasi dari plasenta sapi yang mengalami keguguran oleh Bang pada tahun 1897.

Bakteri tersebut diberi nama *Bacillus abortus* dan penyakit ini dikenal pula sebagai penyakit *Bang* atau *Contagious Abortion* (Merchant and Packer, 1971).

2.4. Keganasan dan Jalannya Penyakit

Brucella abortus akan menyebabkan kerusakan pada uterus sapi betina yang bunting . Permulaan infeksi brucellosis terjadi pada kelenjar limfe supramamaria (Hardjopranjoto, 1995).

Pada uterus menyebabkan terjadinya endometritis yang ulseratif, selanjutnya kotiledon mengalami nekrose disertai terbentuknya eksudat pada lapisan allantokorion (Jenning, 1970; Hardjopranjoto, 1995). Perubahan spesifik oleh *Brucella abortus* adalah terjadinya peradangan pada sel epitel vili korion yang berakibat terjadinya penghancuran jaringan vili korion tersebut. Semua bentuk kelainan dan peradangan oleh *Brucella abortus* menyebabkan terhambatnya atau terhentinya sistem sirkulasi darah yang memberikan nutrisi pada fetus. Bila disertai dengan kerusakan-kerusakan pada jaringan fetus akan mengakibatkan kematian. Fetus yang mati dalam uterus merupakan benda asing sehingga tubuh berusaha untuk mengeluarkannya (Anonimus, 1980; Gillespie and Timoney, 1981). Akibat terjadi peradangan dan pertautan secara luas antara jaringan uterus dengan selaput fetus maka sistem plasentasi fetus dengan induk tidak mudah terlepas sehingga mengakibatkan hampir setiap keguguran oleh *Brucella abortus* disertai dengan retensi plasenta (Maegraith and Gilks, 1971).

2. 5. *Brucella abortus* Strain 19

Brucella abortus Strain 19 diisolasi pertama kali pada tahun 1923 dari susu sapi dan di laporkan oleh Buck (1930) sebagai strain yang mempunyai virulensi rendah, namun efektif bila digunakan sebagai vaksin sapi. Hal ini karena Strain 19 memberikan kekebalan yang tinggi serta tidak menular dari sapi ke sapi lainnya (Arthur *et al.*, 1983).

Virulensi yang rendah dari *Brucella abortus* Strain 19 ini bersifat stabil, dan sifat-sifat tersebut berhasil dipertahankan dengan syarat seleksi bibit bakteri harus dikerjakan secara hati-hati serta penanganan bibit bakteri maupun pengawetan dengan cara kering beku untuk keperluan produksi dilakukan dengan cermat. Selanjutnya *Brucella abortus* Strain 19 digunakan secara intensif oleh Federal Bureau of Animal Industri dan pada tahun 1940 mulai dipergunakan dalam penanggulangan brucellosis di berbagai negara (Alton *et al.*, 1975).

2.5.1. Morfologi *Brucella abortus* Strain 19

Brucella abortus Strain 19 bentuknya bervariasi mulai dari kokobacilli sampai batang pendek dan terletak sendiri-sendiri (Berman, 1981). Bakteri ini termasuk golongan non-motil, tidak membentuk spora, tidak tahan asam, gram negatif dan bersifat aerobik (Buchanan and Gibbons, 1975). Permukaan koloni yang tumbuh di atas agar tampak licin dan mengkilat (Bentuk Smooth/S). Permukaan selnya terdiri dari rantai protein kompleks lipopolisakarida (Schlegel, 1994). Lipopolisakarida ini membawa antigen spesifik A (*abortus*) dan M (*melitensis*) dengan proporsi A dan M

yang berbeda untuk tiap spesies *Brucella* (Carter and Cole, 1990). Perbandingan antara antigen A dan M pada *Brucella abortus* adalah 20 : 1 (Joklik *et al.*, 1980).

2.5.2. Sifat Pupukan

Brucella dapat tumbuh pada perbenihan yang mengandung Serum Dekstrose Agar, Gliserol Dekstrose Agar dan Nutrien Agar (Volk and Wheeler, 1992). Menurut Morgan yang dikutip oleh Soltys (1963), bahwa Medium Potato Agar sangat baik untuk pertumbuhan dan isolasi *Brucella*.

Pertumbuhan pada kultur dipengaruhi oleh keseimbangan antara garam, vitamin dan zat-zat organik yang diperlukan. Temperatur yang diperlukan untuk pupukan adalah 37⁰ C dengan konsentrasi karbondioksida 5-10 %. Sebaliknya Strain 19 dalam pertumbuhannya tidak memerlukan penambahan karbondioksida. Derajat keasaman optimum adalah 6,6 - 7,4 (Margareth, 1976).

Brucella abortus Strain 19 mengalami variasi selama pertumbuhannya pada media pupukan. Hari pertama sampai hari kedua ukuran koloni sebesar 1 sampai 2 milimeter dan sudah mulai memantulkan cahaya. Hari ketiga sampai hari kelima pemupukan, koloni tampak bulat, halus, transparan dan berkilauan dengan tampilan khasnya tampak kebiru-biruan dan transparan (Carter and Cole, 1990). Selanjutnya dari tipe S(Smooth/halus) yang ganas berubah menjadi tipe R(Rough/kasar) disertai perubahan warna menjadi kuning kecoklatan. Pigmentasi ini biasanya terlihat jelas pada Medium Potato Agar.

2.5.3. Sifat Biokimia

Brucella abortus memfermentasikan glukosa, manosa, inositol dan rhamnosa tetapi tidak terhadap trehalosa dan maltosa (Smith, *et al.*, 1968). *Brucella abortus* memproduksi lebih sedikit gas H₂S daripada *Brucella suis* pada media Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (Merchant and Packer, 1971).

2.5.4. Resistensi dan Toleransi

Pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 dipengaruhi oleh beberapa bahan fisika dan kimia. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Jones and Wilson (1965), menunjukkan bahwa *Brucella abortus* Strain 19 dari Weybridge, UK tidak tumbuh dengan penambahan thionin blue, penicillin, safranin O. Untuk penambahan erythritol masih dapat tumbuh. Sebaliknya pada Strain 19 dari USDA penambahan erythritol justru menghambat. Pemberian thionin blue, penicilin dan safranin O menunjukkan hasil yang sama dengan Strain 19 dari Wybridge UK. Sifat-sifat yang membedakan Strain 19 dengan strain lain pada pertumbuhan in vitro adalah sebagai berikut :

1. Strain 19 tidak memerlukan karbon dioksida untuk pertumbuhannya.
2. Strain 19 lebih sensitif terhadap thionin blue.
3. Strain 19 lebih sensitif terhadap penicilin (Kraft, 1955).
4. Jones *et al.* (1964) melaporkan bahwa safranin O juga menghambat pertumbuhan Strain 19.

5. Strain 19 kurang virulen bila dibandingkan strain lapangan .

Hasil tes metabolis oksidatif Strain 19 yang telah dilakukan oleh Alton *et al.* (1975) tertera di bawah ini :

- a. Kecepatan oksidatif Strain 19 terhadap glutamat lebih besar dari pada strain lain *Brucella abortus*.
- b. Kecepatan oksidasi Strain 19 terhadap erythritol secara tetap lebih rendah dari pada strain lain *Brucella abortus*.
- c. Kecepatan oksidasi Strain 19 terhadap L-alanin dua kali lipat dari pada D-alanin.
- d. Kecepatan oksidasi Strain 19 terhadap D-galaktose sama dengan D-ribose.

2.6. Pertumbuhan bakteri

2.6.1. Fisiologi pertumbuhan

Pertumbuhan artinya penambahan substansi hidup yang irreversible dan biasanya disertai penambahan ukuran dan pembelahan sel (Schlegel, 1994). Seperti halnya makhluk hidup lain, maka bakteri harus mempunyai persediaan nutrisi untuk menghasilkan bahan sel yang baru, enzim dan kofaktor (Gross *et al.*, 1995). Nutrisi yang berperan sebagai sumber energi antara lain : karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, sulfur dan beberapa unsur logam dalam jumlah yang sangat sedikit (Pelczar dan Chan, 1986).

2.6.2. Pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19

Bila bakteri ditanam dalam suatu media pupukan, maka bakteri akan terus tumbuh sampai salah satu faktor mencapai minimum sehingga pertumbuhan menjadi terbatas. Bila sepanjang pertumbuhan ini tidak ditambah nutrisi maupun penyaluran produk-produk metabolisme ke luar, maka pertumbuhan seperti inilah yang disebut dengan kultur statik (Carter and Cole, 1990).

Pertumbuhan bakteri dengan mudah dapat dinyatakan secara grafik dengan logaritme jumlah sel hidup terhadap waktu. Schlegel dkk (1994) menggambarkan kurva pertumbuhan dengan bentuk khasnya, sigmoid, serta dapat dibedakan menjadi beberapa tahap pertumbuhan yang muncul secara teratur yaitu : tahap anjang-ancang (lag fase), tahap eksponensial (logaritmik), tahap stasioner dan tahap menuju kematian. Tiap fase pertumbuhan mempunyai ciri yang spesifik dengan selang waktu tertentu seperti yang tercantum di bawah ini.

Pengukuran pertumbuhan secara kuantitatif :

Fase Pertumbuhan	Ciri-ciri
* Lamban (Lag)	Tidak ada pertumbuhan populasi. Sel mengalami perubahan komposisi kimiawi dan ukurannya bertambah serta substansi intraselulernya bertambah.
* Logaritma atau Eksponensial	Sel membelah dengan laju yang konstan. Massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama.

- Aktivitas metabolik konstan.
Keadaan pertumbuhan seimbang.
- * **Statis** Penumpukan produk beracun serta kehabisan nutrisi.
Beberapa sel mati sedangkan yang lain tumbuh dan membelah.
Jumlah sel hidup menjadi tetap.
- * **Penurunan atau kematian** Sel menjadi mati lebih cepat daripada terbentuknya sel-sel baru.
Laju kematian mengalami percepatan menjadi eksponensial. Hal ini tergantung kepada macam spesies. Semua sel akan mati dalam waktu beberapa hari atau beberapa bulan.

Begitu pula faktor pertumbuhan bakteri berbeda antara yang satu dengan lainnya, tergantung pada spesiesnya (Gross *et al.*, 1995).

2.6.3. Kondisi fisik yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri

Bakteri tidak hanya sangat bervariasi dalam persyaratan nutrisinya, tetapi juga menunjukkan respon yang berbeda-beda terhadap kondisi fisik dalam lingkungannya (Pelczar dan Chan, 1986). Hal-hal utama yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut :

1. Nutrisi

Bakteri memerlukan nutrisi untuk mensintesis protoplasma dan penyediaan energi (Volk and Wheeler, 1992). Pemakaian karbon oleh bakteri didapatkan dalam berbagai bentuk antara lain glukosa dalam bentuk yang sederhana, karbondioksida. Sumber nitrogen diperoleh yang diperlukan bakteri berasal dari bentuk yang bervariasi seperti ammonia, nitrat dan asam amino tunggal sederhana (Merchant and Packer, 1971).

2. Suhu

Reaksi kimiawi sangat tergantung pada suhu, karena hal ini akan mempengaruhi pola pertumbuhan bakteri serta semua proses pertumbuhan. Begitu pula laju pertumbuhan dan jumlah total pertumbuhan organisme. Setiap spesies bakteri tumbuh pada kisaran suhu tertentu (Gross *et al.*, 1995). Atas dasar inilah diklasifikasikan sebagai berikut : Psikrofil, Mesofil dan Thermofil (Pelczar dan Chan, 1986).

3. pH

pH untuk pertumbuhan optimum bagi kebanyakan bakteri adalah 6,5 - 7,3. *Brucella abortus* Strain 19 tumbuh baik pada pH 7,0 - 7,3 (Alton *et al.*, 1975).

4. Air

Air sangat penting bagi kehidupan bakteri. Sebagian besar protoplasma terdiri dari air. Bakteri memerlukannya untuk reaksi biologi dalam fungsi metabolik serta berperan dalam sejumlah reaksi enzim (Gross *et al.*, 1995).

5. Kebutuhan terhadap gas

Oksigen dan karbondioksida merupakan salah satu gas utama yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Pelczar dan Chan, 1986). Keragaman respon bakteri sangat luas terhadap oksigen bebas, sehingga dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok diantaranya aerobik, anaerobik, aerobik fakultatif dan mikroaerofilik (Merchant and Packer, 1971).

6. Kondisi lain-lain

Beberapa bakteri memerlukan persyaratan tambahan selain faktor-faktor utama seperti kelembaban.

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma di Jalan Achmad Yani 68-70 Surabaya. Kegiatan penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yang meliputi:

1. Kegiatan Orientasi dan Latihan

Kegiatan orientasi dan latihan ini dimaksudkan untuk orientasi terhadap permasalahan-permasalahan yang mungkin timbul dalam pelaksanaan penelitian, sekaligus dijadikan sebagai pelatihan sebelum pelaksanaan yang sesungguhnya. Kegiatan orientasi dan latihan dilaksanakan tanggal 9 Juni sampai 20 Juni 1997, bertempat di Laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

2. Kegiatan Penelitian

Kegiatan ini dilaksanakan pada tanggal 23 Juni sampai 25 Juli 1997 dan bertempat di Laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Kedua kegiatan yakni orientasi dan latihan serta kegiatan penelitian dilakukan setiap hari Senin sampai Jumat pukul 09.⁰⁰-14.⁰⁰ BBWI.

3. 2. Materi Penelitian

3. 2. 1. Bahan

3.2.1.1. Bibit bakteri *Brucella abortus* Strain 19

Bibit bakteri yang dipakai untuk penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma Surabaya yaitu kultur murni *Brucella abortus* Strain 19 serial 15202, Biologic Reagents Section Animal Health Diagnosis APHS National Disease Lab, Ames Iowa 50010, tahun 1972, dalam bentuk kering beku.

3.2.1.2. Erythritol p.a.

Erythritol untuk penelitian ini diperoleh dari Sigma Chemical Co. USA, dalam bentuk kristal.

3.2.1.3. Bahan-bahan lain

Bahan-bahan lain yang dipakai dalam penelitian ini yaitu: Kentang, Peptone Agar, Beef Ekstrak, Sodium Chlorida p.a., Sodium Glutamat p.a., Glycerin p.a., Agar, Tryptone, Sukrose p.a., *Brucella* Medium Agar dan aquadest.

3.2.2. Alat-alat

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah: gelas Beker 500 ml, labu ukur 50,0 ml; 100,0 ml, Erlenmeyer 50 ml; 100 ml, pipet volume berukuran 1,0 ml; 2,0 ml; 10,0 ml, gelas ukur 25 ml; 50 ml; 100 ml, botol roux kecil, botol susu 100 ml; 1000 ml, tabung reaksi bertutup 10 ml, cawan petri, spuit otomatis, microphore 0,22 μ , kaleng aluminium, laminar flow, neraca analitik 0,001, Neraca O'Hauss, autoclave,

baby autoclave, magnetik stirer, rak tabung reaksi, refrigerator, oven, inkubator, pH meter, aluminium foil, benang, kapas berlemak, kapas putih, kain kasa, kertas koran, kertas perkamen, kertas saring, selotip, karet, lampu bunsen dan tali rami.

3. 3. Metode Penelitian

Metode penelitian ini berdasarkan standar World Health Organization (WHO) 1975, dalam bukunya *Laboratory Techniques in Brucellosis*.

3. 3. 1. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan dicuci bersih menggunakan rinso selanjutnya alat yang tahan panas disterilisasi kering menggunakan oven selama 120 menit, 180^o C atau sterilisasi basah menggunakan autoclave bertekanan 121 atmosfer selama 20 menit sesuai dengan macam dan sifat bahan. Selama sterilisasi semua alat dalam keadaan tersumbat rapat oleh kapas berlemak, kertas koran, kertas perkamen maupun aluminium foil dan difiksasi dengan tali rami untuk memperkecil kemungkinan kontaminasi.

3. 3. 2. Pembuatan larutan tepung kentang

Gelas Beker diisi aquades sebanyak 400 ml, ke dalamnya dimasukkan kentang yang telah dipasrah menggunakan superslicer. Apabila aqua yang digunakan 400 ml, maka kentang yang dibutuhkan untuk pembuatan tepung kentang kira-kira sebanyak

dua buah dengan berat 200 gram. Gelas Beker berisi aquades dan kentang yang telah dipasrah diendam selama 24 jam dalam inkubator. Yang dipakai dalam penelitian ini adalah air kentang yang telah diendam.

3. 3. 3. Pembuatan larutan erythritol

Kristal erythritol sebanyak 200 mg dilarutkan dalam aquades hingga 50 ml dikocok hingga homogen dimasukkan dalam gelas ukur. Diambil 25 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer, sebagai larutan uji I dengan konsentrasi 4000 ppm. Sisa 25 ml lainnya ditambah aquades hingga 50 ml dan dikocok hingga homogen, diambil 25 ml sebagai larutan uji II dengan konsentrasi 2000 ppm. Selanjutnya dilakukan dengan cara yang sama hingga didapatkan larutan uji III dengan konsentrasi 1000 ppm, larutan uji IV dengan konsentrasi 500 ppm dan larutan uji V dengan konsentrasi 250 ppm. Untuk larutan uji VI diperoleh dengan cara mengambil 10 ml sisa dari larutan uji V kemudian ditambah aquades hingga 25 ml kocok hingga homogen. Sedangkan larutan uji VII (kontrol) dengan menggunakan aquades sebanyak 25 ml. Semua larutan uji disimpan dalam refrigador (pendingin) selama membuat Medium Potato Agar, hingga dipakainya larutan uji I s/d VII ini .

3. 3. 4. Pembuatan medium potato agar

Agar sebanyak 7 g, Peptone agar 3,5 g, Beef ekstrak 1,75 g, Sodium Chlorida p.a. 1,75 g ditimbang dengan menggunakan neraca analitik serta glycerin p.a. 7 ml

menggunakan pipet volume. Semua bahan dimasukkan dalam gelas beker 200 ml. Ditambahkan air kentang sebanyak 175 ml dan diaduk hingga homogen. Setelah itu pH diatur hingga mencapai range 6,8 hingga 7,3 dengan cara menambahkan dengan NaOH 0,1 M apabila pH kurang dari 6,8 atau dengan HCl 0,1 M apabila pH lebih besar dari 7,3. Pada penelitian ini dicapai hingga pH 7,0. Penambahan NaOH ataupun HCl dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes secara perlahan-lahan ke dalam larutan kemudian tabung Erlenmeyer digoyang-goyangkan sehingga larutan menjadi homogen. Apabila pH yang diinginkan belum tercapai, maka diberikan lagi setetes kemudian tabung Erlenmeyer digoyang-goyang hingga homogen.

Setelah itu dibagi ke dalam tujuh tabung Erlenmeyer masing-masing 25 ml. Kemudian ditambahkan dengan larutan uji I s/d VII ke dalam masing-masing erlenmeyer tersebut hingga didapatkan volume 50 ml larutan dengan konsentrasi erythritol menjadi setengah dari semula yaitu 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm dan 50 ppm. Sedangkan kontrol tetap 0 ppm (tanpa erythritol). Erlenmeyer yang berisi 2000 ppm erythritol dikocok hingga homogen dan dituang ke dalam tiga botol roux kecil masing-masing 16 ml. Demikian pula untuk erlenmeyer yang berisi 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 50 ppm dan kontrol dilakukan dengan cara yang sama hingga diperoleh sebanyak 21 botol roux kecil dengan tujuh konsentrasi yang berbeda.

Masing - masing mulut botol kecil disumbat rapat dengan kapas berlemak yang dibalut kain kasa, selanjutnya ditutup kertas koran dan difiksasi dengan karet.

Keduapuluhsatu botol roux tersebut disterilisasi basah dalam autoclave 120°C selama 25 menit, didinginkan dalam laminar flow dengan posisi horisontal. Kemudian dieramkan pada suhu 37°C selama 48 jam dalam posisi agar terbalik supaya air kondensasi menetes (terkumpul).

3.3.5. Pemiakan bakteri

Satu vial bibit bakteri *Brucella abortus* Strain 19 dibuka secara aseptis, kemudian dilarutkan dengan 100 ml NaCl fisiologis. Suspensi bakteri yang telah dilarutkan diambil sebanyak 12,6 ml kemudian dibagi untuk 21 botol roux kecil yang telah berisi Medium Potato Agar kemudian dipupukkan masing-masing 0,6 ml menggunakan spuit otomatis. Suspensi bakteri dipermukaan Agar tersebut diratakan dengan cara digoyang pelan sambil diusahakan agar cairan jangan sampai mengenai sumbat kapas. Langkah terakhir dieramkan selama 48 jam dalam inkubator 37°C . Selanjutnya dipanen.

3.3.6. Panen

Botol roux dikeluarkan dari inkubator dengan hati-hati dan dipindah kedalam laminar flow. Dengan spuit otomatis masing-masing botol diberi stabilizer 2 ml. Botol roux digoyang-goyang sedemikian rupa untuk meluruhkan bakteri yang telah tumbuh dengan hati-hati tanpa menyentuh sumbat kapas. Setiap hasil panen dari satu botol roux ditampung dalam satu tabung reaksi bertutup dan dilabel sehingga

diperoleh 21 tabung reaksi. Hasil panen disimpan dalam refrigerator hingga dilakukan langkah berikutnya, yaitu penghitungan koloni bakteri.

3.3.7. Penghitungan jumlah koloni bakteri

Penghitungan jumlah koloni bakteri dilakukan dengan modifikasi dari metode Miles and Misra yang dikutip oleh Alton *et al.* (1975), yaitu dengan cara mengencerkan suspensi bakteri dengan kelipatan 10 sampai diperoleh pengenceran 10^9 dan 10^{10} . Hasil dari dua pengenceran terakhir tersebut ditanam pada Medium Brucella Agar masing-masing pengenceran pada 3 media dengan metode tuang. Tiap medium agar ditanami resuspensi bakteri sebanyak 0,50 ml menggunakan spuit otomatis. Selanjutnya Medium Brucella Agar dieramkan pada suhu 37^0 C selama 96 jam. Koloni yang tumbuh dari setiap pengenceran dihitung dan dirata-rata (rata-rata jumlah koloni *Brucella abortus* Strain 19 yang tumbuh dapat dilihat pada tabel 2).

Jadi jumlah koloni *Brucella abortus* Strain 19 pada media pupuk adalah rata-rata jumlah koloni yang tumbuh pada Brucella Medium Agar pada pengenceran 10^9 dan 10^{10} kemudian dimasukkan dalam rumus penghitungan jumlah bakteri dalam satu mililiter yang dikutip dari Volk and Wheeler (1992) (Lihat lampiran 2). Satuannya koloni per mililiter. Selanjutnya data yang diperoleh dicatat dan dikumpulkan kemudian dianalisis secara statistik.

3.4. Peubah

Penelitian ini menggunakan peubah bebas sebagai perlakuan (Steel and Torrie, 1993). Adapun peubah bebas dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi erythritol yang ditambahkan pada Medium Potato Agar. Peubah tak bebasnya adalah jumlah koloni yang tumbuh pada Medium Brucella Agar setelah hari keempat penanaman pada media tersebut.

3.5. Analisis Data

Data hasil pengamatan berupa banyaknya koloni *Brucella abortus* Strain 19 yang tumbuh pada Medium Brucella Agar ini ditabulasikan, selanjutnya dilakukan analisis hasil pengamatan dengan analisis varian. Uji signifikansi dalam analisis varian digunakan Uji F (Dixon and Massey, 1991). Bila dengan Uji F ternyata ada perbedaan maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Duncan untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik (Kusriningrum, 1989).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil yang diperoleh dari pengamatan terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 dengan pemberian erythritol pada berbagai konsentrasi dan kontrol dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 2. Rata-rata Jumlah Koloni *Brucella abortus* Strain 19 (10^{10} koloni per ml) pada Hari Keempat setelah Pemupukan.

Ulangan	Perlakuan						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Rataan	35,70 ^a	35,53 ^a	31,33 ^a	30,90 ^a	8,40 ^b	0 ^b	0 ^b
SimpanganBaku	5,85	5,73	5,26	3,08	2,19	0	0
Ulangan	3	3	3	3	3	3	3
Rentangan	29,00- 39,80	30,80- 41,90	24,10- 35,00	28,10- 34,20	6,00- 10,30	0-0	0-0

Keterangan : Superskrip untuk huruf yang berbeda menunjukkan tingkat perbedaan yang bermakna pada perlakuan dengan taraf signifikansi 1%

P0 : Kontrol

P1 : Pemberian erythritol konsentrasi 50 ppm

P2 : Pemberian erythritol konsentrasi 125 ppm

P3 : Pemberian erythritol konsentrasi 250 ppm

P4 : Pemberian erythritol konsentrasi 500 ppm

P5 : Pemberian erythritol konsentrasi 1000 ppm

P6 : Pemberian erythritol konsentrasi 2000 ppm

Tabel pada halaman sebelumnya memperlihatkan bahwa pemberian erythritol pada konsentrasi 0 ppm (kontrol) menunjukkan rata-rata tertinggi yaitu $(35,7 \pm 58,5) \times 10^{10}$ koloni per ml. Diikuti oleh pemberian pada konsentrasi 50 ppm yaitu sebanyak $(35,53 \pm 5,73) \times 10^{10}$ koloni per ml. Kemudian pada konsentrasi 125 ppm dan 250 ppm didapatkan jumlah rata-rata koloni masing-masing $(31,33 \pm 5,26) \times 10^{10}$ dan $(30,90 \pm 3,08) \times 10^{10}$ koloni per ml. Selanjutnya pemberian erythritol pada konsentrasi 500 ppm didapatkan jumlah koloni yang jauh lebih sedikit yaitu $(8,4 \pm 2,19) \times 10^{10}$, sedangkan pemberian erythritol pada konsentrasi 1000 ppm dan 2000 ppm tidak terdapat pertumbuhan koloni sama sekali sampai dengan hari keempat pemupukan.

Setelah dilakukan uji statistik analisis varian dengan menggunakan Uji F maka diperoleh hasil bahwa antara kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata dengan kontrol untuk taraf signifikansi 1% ($p < 0,01$). Selanjutnya melalui Uji Jarak Duncan dapat terbukti bahwa konsentrasi erythritol 50 ppm, 125 ppm, 250 ppm dan kontrol tidak berbeda nyata. Perhitungan statistik Uji F dan Uji Jarak Duncan secara lengkap terdapat pada lampiran 4 dan lampiran 5.

Berdasarkan analisis statistik yang tertera pada lampiran 2 dan lampiran 3 didapatkan bahwa tingkat penambahan erythritol mulai 50 ppm hingga 250 ppm sudah terdapat hambatan terhadap pertumbuhan koloni *Brucella abortus* Strain 19 terbukti dengan makin sedikitnya jumlah koloni yang tumbuh pada hari keempat setelah pemupukan pada Medium Brucella Agar. Keadaan ini makin terlihat jelas

pada konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm. Terbukti bahwa dengan perlakuan 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm terdapat perbedaan yang sangat nyata.

BAB V

PEMBAHASAN

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Uji F menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi erythritol pada Medium Potato Agar terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 menggambarkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) antara perlakuan dengan konsentrasi erythritol 50 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm dengan 0 ppm. Namun uji statistik selanjutnya yang menggunakan Uji Jarak Duncan memperlihatkan tidak adanya perbedaan yang sangat nyata antara pemberian erythritol dengan konsentrasi 50 ppm, 125 ppm dan 250 ppm dengan 0 ppm (kontrol). Sementara itu penambahan erythritol pada konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata bila dibandingkan dengan tanpa pemberian erythritol (kontrol) (lihat Tabel 2).

Berdasarkan hasil pengamatan disimpulkan bahwa pemberian erythritol pada Medium Potato Agar pada konsentrasi 50 ppm, 125 ppm dan 250 ppm mulai didapatkan adanya hambatan terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 yang terlihat pada Medium Brucella Agar. Namun berdasarkan Uji Jarak Duncan hambatan tersebut tidak berarti karena pertumbuhan yang terjadi hampir sama dengan kontrol. Pada tabel 2., terlihat bahwa rata-rata jumlah koloni yang tumbuh mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi erythritol yang diberikan pada Medium Potato Agar.

Penelitian sebelumnya yang mendukung hasil penelitian ini adalah Smith *et al.*, yang dikutip oleh Jones *et al.*, (1965) menunjukkan bahwa pemberian erythritol 50 ppm dalam Medium Trypticase Soy Agar pada *Brucella abortus* Strain 19 didapatkan adanya pertumbuhan, walaupun tidak dijelaskan pertumbuhan yang dimaksud oleh peneliti tersebut. Selanjutnya dikatakan oleh Jones *et al.*, (1965) bahwa pemberian erythritol konsentrasi 1000 ppm pada Medium Trypticase Soy Agar menyebabkan hambatan secara total oleh adanya senyawa tersebut.

Erythritol konsentrasi 500 ppm yang ditambahkan pada Medium Potato Agar menunjukkan rataan jumlah koloni yang menurun secara drastis jika dibandingkan dengan konsentrasi sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan erythritol di dalam Medium Potato Agar pada konsentrasi yang semakin tinggi memberikan efek hambatan yang semakin kuat. Terbukti bahwa pada konsentrasi 500 ppm ini dengan menggunakan analisis statistik menggunakan Uji Jarak Duncan terlihat adanya perbedaan yang sangat nyata dengan kontrol. Makin kuatnya efek hambatan erythritol pada konsentrasi ini disebabkan oleh makin kuatnya aktivitas erythritol kinase (Sperry and Robertson^b, 1975). Pernyataan kedua peneliti ini dapat dijelaskan pada alinea dibawah ini.

Sperry dan Robertson^b menjelaskan bahwa *Brucella abortus* Strain 19 tidak memiliki enzim D-erythrulose 1 phosphate dehydrogenase sebagaimana yang dimiliki oleh *Brucella abortus* strain lain sehingga enzim lainnya, yaitu erythritol kinase mengalami peningkatan aktivitas. Peningkatan aktivitas erythritol kinase

yang terjadi mengakibatkan ATP persediaan yang akan digunakan untuk aktivitas seluler mengalami penurunan. Disebutkan oleh Harper (1983) bahwa ATP merupakan fosfat berenergi tinggi yang siap digunakan dalam berbagai proses sintesa biokimia sel selain memperoleh energi dari bentuk lain, yaitu cahaya. Penurunan ATP di dalam sel mengakibatkan energi yang diperlukan untuk biosintesis berbagai komponen biokimia sel, yaitu DNA, RNA, dinding sel peptidoglikan dan fosfolipid membran sel menjadi terhambat (Pelczar, *et al.*, 1993). Akibatnya pembentukan sel bakteri terhambat sehingga pembentukan koloni yang tumbuh pada media pupuk menjadi berkurang.

Penambahan erythritol dengan konsentrasi yang semakin besar pada Medium Potato Agar menyebabkan aktivitas erythritol kinase yang semakin meningkat. Selanjutnya pengosongan persediaan ATP yang terjadi semakin besar. Dengan kata lain energi untuk proses pembentukan sel yang hilang semakin besar dan peluang terjadinya pertumbuhan semakin kecil. Hal ini terlihat pada jumlah koloni yang tumbuh semakin berkurang seiring dengan peningkatan konsentrasi erythritol yang ditambahkan pada Medium Potato Agar.

Terlihat pada tabel 2, bahwa pemberian erythritol pada Medium Potato Agar dengan konsentrasi 1000 ppm dan 2000 ppm menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan koloni *Brucella abortus* Strain 19 secara total. Hal ini diperlihatkan dengan tidak ditemukannya pertumbuhan koloni sama sekali pada Medium Brucella Agar di kedua konsentrasi tersebut hingga hari keempat setelah

pemupukan. Kenyataan ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Alton *et al.* (1975) dan Jones *et al.*, (1965).

Alton *et al.*, (1975) mengatakan bahwa pemberian erythritol 1000 ppm atau di atas konsentrasi ini akan terjadi hambatan secara total pada pertumbuhan koloni *Brucella abortus* Strain 19. Pernyataan ini mendukung penelitian yang telah dilakukan oleh Jones *et al.*, (1965) tentang pengaruh erythritol terhadap 100 strain *Brucella* menyimpulkan bahwa hambatan pertumbuhan hanya terjadi pada satu kultur saja yaitu *Brucella abortus* Strain 19. Selanjutnya dikatakan oleh Jones *et al.*, (1965) bahwa kultur *Brucella abortus* Strain 19 dihambat sama sekali pertumbuhannya oleh penambahan Erythritol konsentrasi 1000 ppm, sementara itu strain lain dari *Brucella abortus* dirangsang pertumbuhannya dengan pemberian erythritol 2000 ppm.

Hambatan pertumbuhan koloni *Brucella abortus* Strain 19 yang terlihat pada Medium *Brucella* Agar dengan adanya penambahan erythritol pada Medium Potato Agar sangat berkaitan dengan unsur penyusun senyawa ini. Pelczar dan Chan (1986) menyatakan bahwa semua makhluk hidup tidak terkecuali bakteri mutlak membutuhkan nitrogen untuk pertumbuhannya. Nitrogen merupakan salah satu unsur utama yang sangat diperlukan untuk pembentukan asam amino. Pernyataan ini didukung oleh Volk dan Wheeler (1992) bahwa sejumlah nitrogen harus tersedia bagi kelangsungan pertumbuhan bakteri karena semua protein dan asam nukleat mengandung unsur tersebut. Sebaliknya, dengan melihat struktur kimia, erythritol tidak mengandung unsur nitrogen sebagaimana yang sangat

dibutuhkan untuk kelangsungan pertumbuhan bakteri. Seperti yang telah diketahui bahwa erythritol mengandung unsur carbon, hidrogen dan oksigen dengan masing-masing prosentase 39,34%, 8,25% dan 52,41%. Sehingga dapat dikatakan bahwa berdasarkan kandungan unsur erythritol, maka senyawa ini tidak dapat meningkatkan pertumbuhan dalam hal ini *Brucella abortus* Strain 19.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh berdasarkan hasil penelitian dengan analisis Uji F yang dilanjutkan dengan Uji Jarak Duncan tentang pengaruh penambahan berbagai konsentrasi erythritol pada Medium Potato Agar terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 :

Pemberian erythritol pada konsentrasi 50 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm terlihat adanya hambatan terhadap pertumbuhan yang semakin nyata seiring dengan peningkatan konsentrasi erythritol yang diberikan pada Medium Potato Agar ditandai dengan berkurangnya jumlah koloni *Brucella abortus* Strain 19 yang tumbuh pada Medium Brucella Agar.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diberikan saran sebagai berikut :

1. Pada Medium Potato Agar sebaiknya tidak diberi erythritol untuk kepentingan produksi vaksin Brucellosis yang menggunakan bakteri *Brucella abortus* Strain 19.
2. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang pemberian erythritol yang ditambahkan pada media pupuk lain selain Medium Potato Agar.

RINGKASAN

Sinta Pawestri. Penelitian ini tentang pengaruh pemberian erythritol pada media pupuk *Brucella abortus* Strain 19 secara *in vitro*. Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu Kegiatan Orientasi dan Latihan serta Kegiatan Penelitian. Seluruh kegiatan dilaksanakan selama dua bulan di Laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi erythritol pada Medium Potato Agar terhadap pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19. Hal ini diamati pada jumlah koloni yang tumbuh pada Medium *Brucella* Agar setelah hari keempat pemupukan.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Brucella abortus* Strain 19 yang diperoleh dari Laboratorium Zoonosis Pusat Veterinaria Farma Surabaya dalam bentuk kering beku. Selanjutnya penelitian ini dibagi dalam tujuh perlakuan dan tiga ulangan. Ketujuh perlakuan tersebut masing-masing adalah P0 tanpa penambahan erythritol (kontrol), P1 pemberian erythritol dengan konsentrasi 50 ppm, P2 konsentrasi 125 ppm, P3 konsentrasi 250 ppm, P4 konsentrasi 500 ppm, P5 konsentrasi 1000 ppm dan P6 konsentrasi 2000 ppm pada Medium Potato Agar. Perlakuan ditambahkan pada saat pembuatan media Potato Agar. Satu vial bibit bakteri *Brucella abortus* Strain 19 diencerkan dengan NaCl fisiologis kemudian dipupukkan pada Medium Potato Agar. Media pupuk dieramkan selama 48 jam setelah itu dipanen dengan stabilizer. Selanjutnya hasil

panen diencerkan dengan NaCl fisiologis hingga 10^9 dan 10^{10} kemudian dipupukkan pada Medium Brucella Agar dan dieramkan selama 96 jam. Data yang diperoleh berupa jumlah koloni *Brucella abortus* Strain 19 (koloni per mililiter) yang tumbuh pada hari keempat setelah pemupukan kemudian dianalisis menggunakan analisis varian. Uji signifikansi analisis varian dilakukan dengan Uji F, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan Uji Jarak Duncan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata jumlah koloni *Brucella abortus* Strain 19 terbanyak diperoleh pada P0 (kontrol) sebanyak $(35,70 \pm 5,85) \times 10^{10}$. Selanjutnya penurunan jumlah koloni berturut-turut diikuti pada P1 sebanyak $(35,53 \pm 5,73) \times 10^{10}$, P2 sebanyak $(31,3 \pm 5,26) \times 10^{10}$. Berikutnya P3 didapatkan $(30,90 \pm 3,08) \times 10^{10}$ dan P4 sebanyak $(8,40 \pm 2,19) \times 10^{10}$ sedangkan pada P5 dan P6 didapatkan hasil yang sama yaitu tidak terjadi pertumbuhan sama sekali pada Medium Brucella Agar.

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian erythritol dengan konsentrasi 50 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan *Brucella abortus* Strain 19 ($p < 0,01$), dilihat dari jumlah koloni yang tumbuh pada media tersebut. Uji Jarak Duncan menunjukkan tidak adanya perbedaan ($p > 0,01$) antara konsentrasi 50 ppm, 125 ppm dan 250 ppm dengan kontrol, sedangkan konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan kontrol ($p < 0,01$).

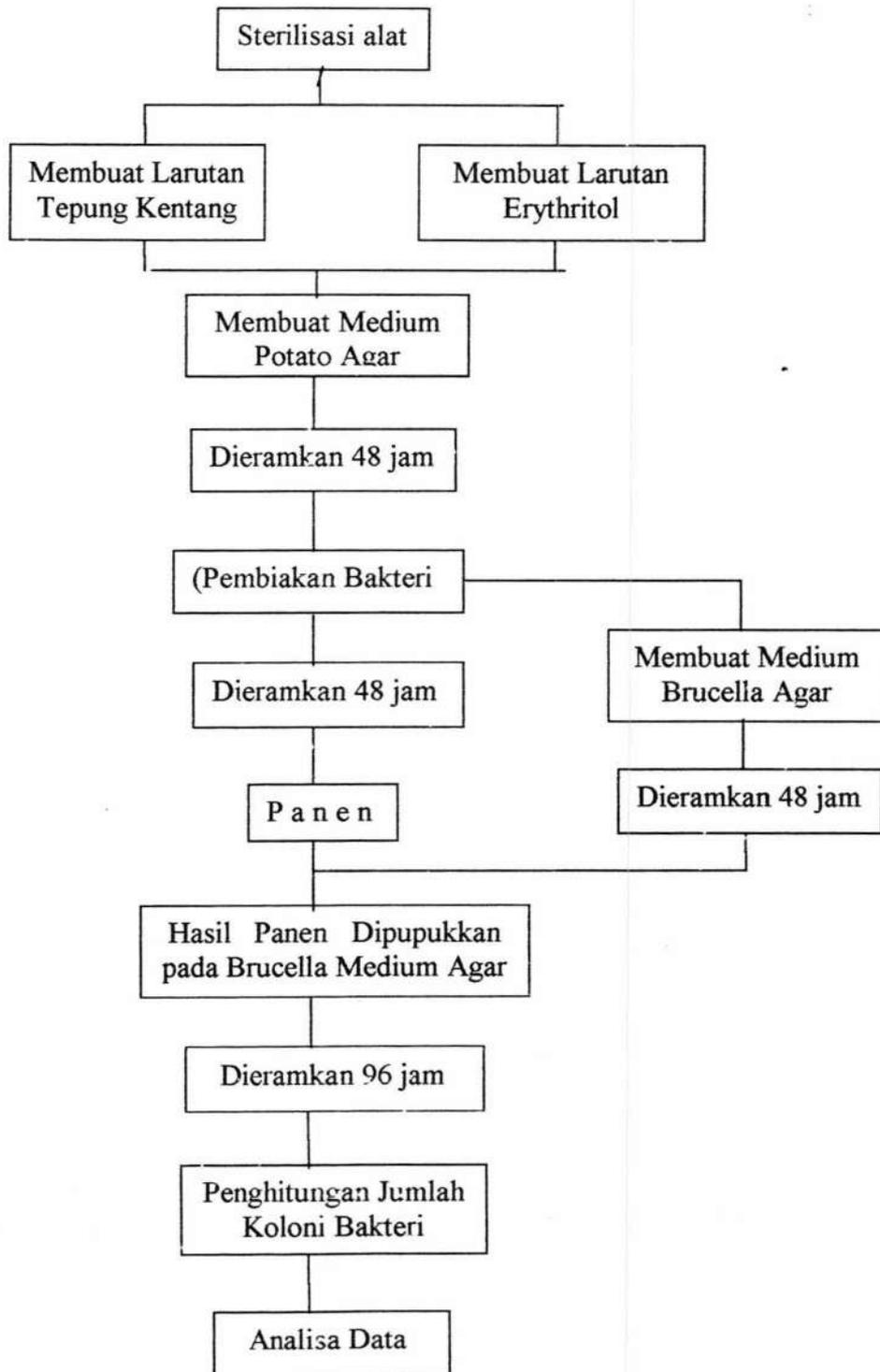
DAFTAR PUSTAKA

- Alton, G. G., and D. E. Pietz. 1975. Laboratory Techniques In Brucellosis. Second Edition. World Health Organization, Geneva. 48-163.
- Anonimus. 1980. Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular Jilid I. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian Jakarta. 62-73.
- Anonimus. 1989. The Merck Index An Encyclopedia Of Chemicals, Drugs and Biologicals. Eleventh Edition. Merck and CO., Inc. New York. 576-577.
- Anonimus. 1991. Annual Report 1990/1991. Research Institute For Veterinary Science Agency For Agriculture Research And Development. Bogor. 28.
- Anonimus. 1996. Reagent Chemicals and Diagnostics. Merck KGaA. Darmstadt. Germany. 3600.
- Arthur, G.H. , D.E. Noakes and H. Pearson. 1983. Veterinary Reproduction and Obstetric (Theriogenology). Bailliere Tindall. London. 397-398.
- Berman, T. D. 1981. Brucellosis Disease of Cattle in The Tropics. Ristic, M. and McIntyre, W.I.M. Eds. Nijhoff Publishers. 271 - 286.
- Blakely, J and D. H. Bade. 1991. Ilmu Peternakan. Edisi Keempat. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 250.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1975. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed. The Williams and Wilkins. Baltimore. 278-281.
- Carter, G. R. and Cole, Jr. J. R. 1990. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. Fifth Edition. Academic Press, Inc. California. 95-97
- Diaz, R., L.M. Jones, D. Leong and J. B. Wilson. 1968. Surface Antigens of smooth Brucellae. Journal of Bacteriology. 96 (4) : 893-901.
- Dixon, W.J. dan F. J. Massey. 1991. Pengantar Analisis Statistik. Edisi Keempat. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Gillespie, J. H. and J. F. Timoney. 1981. Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals. Seventh Edition. Comstock Publishing Associates, A Division of Cornell University Press. Ithaca and London.

- Gross, T., J. Faull, S. Ketteridge and D. Springham. 1995. *Introductory Microbiology*. First Edition. Alden Press, Oxford. 30-34
- Hardjopranjoto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya. 215-217.
- Harper, A. 1983. *Review of Biochemistry*. 19th Ed. Moruzen Asian Editor. San Fransisco, California. 56-109.
- Jenning, A.R. 1970. *Animal Pathology*. First Edition. Bailliere Tindall and Casell. London. 161-163, 170.
- Joklik, W.K., H. P. Willet and D. B. Amos. 1980. *Zinsser Microbiology*. 17th Edition. Appleton Century Crofts. New York. 797-803.
- Jones, L.M., V. Montgomery and J.B. Wilson. 1965. Characteristics of Carbondioksid independent cultures of *Brucella abortus* isolated from cattle vaccinated with strain 19. *J. Infectious Disease*. 115:312-320.
- Harper, A. 1983. *Review of Biochemistry*. 19th Ed. Moruzen Asian Editor. San Fransisco, California. 56-109.
- Kraft, M.E. 1955. *American Journal Veterinary Research* 16. 295-296.
- Kusriningrum, R. 1989. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga Surabaya.
- Margareth, E.M. 1976. Evolution and taxonomy in genus *Brucella*. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 37 : 199-214.
- Maegraith, B.C. and H. M. Gilks. 1971. *Management and Treatment Tropical Disease*. Blake Well, Scientific, Publication Oxford. 82-89.
- Merchant, I.A. and R.A. Packer. 1971. *Veterinary Bacteriology and Virology*. 7th Ed. 3rd printing. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA. 149-153, 315-327
- Naibaho, M. dan Ratih R. 1982. *Bakteriologi Umum*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 141- 148.

- Ressang, A. A. 1984. Patologi Khusus Veteriner. Edisi Kedua. N.V. Percetakan Bali. 405-409.
- Schlegel, H.G. 1994. Mikrobiologi Umum. Edisi Keenam. Gadjah Mada University Press. 202-237.
- Smith, D.T., N.V. Conant and H.P. Willet. 1968. Zinsser Microbiology. 14th Ed. Appleton Century Crofts, Division of Meredith Corporation. New York. 608-677.
- Smith, H., A.E. Williams, J.H. Pearce, J. Keppie, P.W. Harris-Smith, R.B. Fitzgeorge and K. Witt. 1962. Foetal erythritol : A cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. Nature. London. 6 (4810) : 47-49.
- Soebronto. 1993. Ilmu Penyakit Ternak I. Edisi Ketiga. Gadjah Mada University Press. 464-484.
- Soehadji. 1993. Prospek Pembangunan Sub Sektor Peternakan Dalam Meningkatkan Kesejahteraan Masyarakat Pada Pembangunan Nasional Jangka Panjang Tahap II. Prosiding Pada Pekan Temu Ilmiah dan Olah Raga Ikatan Senat Mahasiswa Kedokteran Hewan Se-Indonesia Di Yogyakarta. 11-12.
- Soltys, M.A. 1963. Bacteria and Fungi Pathogenics to Man and Animals. Bailliere Tindall and Cox. London. 107-126.
- Sperry, J.F. and D.C. Robertson^a. 1975. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. Journal Bacteriology. 121 (2) : 619-630.
- Sperry, J.F. and D. C. Robertson^b. 1975. Inhibition of growth by Erythritol Catabolism In *Brucella abortus*. Journal Bacteriology 124(1):391-397.
- Steel , R.G.D. dan J.H. Torrie. 1983. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi Kedua. PT. Gramedia Pustaka Utama Jakarta.
- Volk, A. Wesley and M.F. Wheeler. 1992. Basic Microbiology. Seventh edition. Harper Collins Publishers Inc. New York. 69-78.
- William, A. E., J. Keppie and H. Smith. 1964. The Relation of erythritol usage to virulence in the Brucelias. Journal General Microbiology. 37: 285-295.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Urutan Kerja Penelitian

Lampiran 2. Pembuatan Bahan-bahan Penelitian

Pembuatan Stabilizer

Tryptone 5 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan aquades hingga 100 ml. Larutan dikocok hingga homogen (Larutan I). Selanjutnya Sucrose p.a. 10 g dan Sodium Glutamat p.a. 2 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan aquades hingga 100 ml. Larutan dikocok hingga homogen (Larutan II). Selanjutnya larutan I dan II dicampur, setelah itu digoyang-goyang agar larutan I dan II tercampur merata. Stabilizer yang terbentuk difiltrasi menggunakan microphore 0,22 μ . Mulut erlenmeyer ditutup rapat dengan aluminium foil, dan difiksasi dengan tali setelah itu disterilisasi basah 121⁰ C selama 20 menit. Stabilizer didinginkan dan disimpan dalam inkubator.

Pembuatan NaCl fisiologis

Sebanyak 4,25 g NaCl p.a. dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan aquades hingga 500 ml. Larutan diaduk hingga homogen, setelah itu dimasukkan dalam botol susu kemudian ditutup dengan kertas perkamen dan difiksasi dengan tali rami. Selanjutnya NaCl fisiologis yang telah dibuat disterilisasi presto selama 30 menit.

Lanjutan Lampiran 2.

Pembuatan Medium Brucella Agar

Brucella Medium Agar sebanyak 32 g dimasukkan ke dalam gelas beker. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga 2100 ml dan diaduk hingga homogen. Kemudian larutan dibagi menjadi tiga botol susu bertutup ukuran 1000 ml masing-masing diisi sebanyak 700 ml. Berikutnya larutan disterilisasi dalam autoclave selama 30 menit. Setelah itu dituang ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 30 ml pada saat Brucella Medium Agar masih panas serta dilakukan di dekat api bunsen di dalam laminar flow. Gelembung-gelembung yang terbentuk selama penuangan Brucella Medium Agar dihilangkan dengan cara mendekatkan nyala api bunsen ke agar tersebut. Medium Brucella Agar didinginkan selama empat jam. Setelah agar dingin cawan petri dibalik dan diinkubasi selama 48 jam. Selanjutnya Medium Brucella Agar siap untuk digunakan.

Lampiran 4. Analisis Statistik Jumlah Koloni Per Militer Suspensi Bakteri dengan Uji F

Lampiran 4.1. Jumlah Koloni *Brucella abortus* Strain 19 (koloni per mililiter) pada Hari Ketujuh setelah Pemupukan ($\times 10^{10}$)

Ulangan	Perlakuan							Total
	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	
1	29,00	33,90	35,00	28,10	6,00	0	0	
2	38,30	30,80	34,90	34,20	10,30	0	0	
3	39,80	41,90	24,10	30,40	8,90	0	0	
ΣX	107,10	106,60	94,00	92,70	25,20	0	0	425,60
\bar{X}	35,70	35,53	31,33	30,90	8,40	0	0	20,27
SD	5,85	5,73	6,26	3,08	2,19	0	0	

Perhitungan :

$$FK = \frac{(42,5)^2}{21} = (8625,493)$$

$$\begin{aligned} JKT &= (33,9)^2 + (28,1)^2 + \dots + 0^2 - (8625,49) \\ &= (13873,92) - (8625,49) \\ &= (5248,43) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= (10,6,6)^2 + (92,7)^2 + \dots + (0)^2 - (8625,49) \\ &= (13632,77) - (8625,49) \\ &= (5007,28) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKS &= JKT - JKP \\ &= (5248,43) - (5007,28) \\ &= (241,15) \end{aligned}$$

$$KTP = \frac{JKP}{t-1} = \frac{(5007,27)}{7-1} = (834,55)$$

Lampiran 3. Menghitung Jumlah Bakteri dalam Satu Mililiter

Menurut Voik and Wheeler (1992), jumlah bakteri dalam satu mililiter dapat dihitung dengan rumus :

$$B_0 = (D) \times (C) \times 2$$

Keterangan :

B_0 = Jumlah bakteri dalam satu mililiter cuplikan asli

D = Faktor pengenceran

(contoh : untuk pengenceran 10^{-9} , maka $D = 1.000.000.000$)

C = Jumlah koloni yang dihitung

2 = Jumlah yang ditanam 1/0,5 ml

Lanjutan Lampiran 4.2.

$$KTS = \frac{JKS}{t(n-1)} = \frac{(241,15)}{14} = (17,23)$$

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTS} = \frac{(834,55)}{(17,23)} = 48,45$$

Keterangan :

Angka dalam tanda kurung pada perhitungan menunjukkan dalam 10^{10}

Lampiran 4.2. Sidik Ragam Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Koloni *Brucella abortus* strain 19 pada Hari Keempat setelah Pemupukan

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	6	5007,27	844,55	48,45**	2,85	4,46
Galat	14	241,15	17,23			
Total	20	5248,43				

Keterangan :

KTP = Kuadrat Tengah Perlakuan

KTS = Kuadrat Tengah Sisa

SK = Sumber Keragaman

db = derajat bebas

JK = Jumlah Kuadrat

KT = Kuadrat Tengah

** = berbeda sangat nyata ($p < 0,01$)

Kesimpulan :

Ternyata bahwa tujuh macam konsentrasi erythritol yang ditambahkan pada Medium *Brucella* Agar memberikan perbedaan yang sangat nyata terhadap jumlah koioni *Brucella abortus* Strain 19 yang tumbuh pada hari keempat setelah pemupukan (sebab $F_{hitung} > F_{tabel}$) ($p < 0,01$).

Lampiran 5. Perhitungan Statistik Dengan Uji Jarak Duncan

Lampiran 5. Selisih Rata-rata Perlakuan

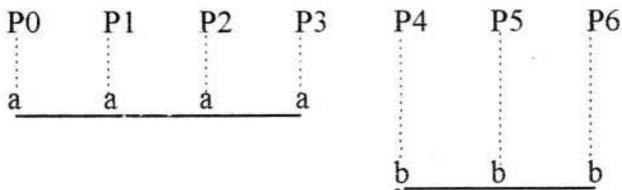
Perlakuan	Rata-rata Perlakuan (\bar{X})	B e d a						P	SSR	LSR
		P6	P5	P4	P3	P2	P1			
P0	35,70 ^a	35,70*	35,70*	27,30*	4,80*	4,37	0,17	7	3,40	5,33
P1	35,53 ^a	35,53*	35,53*	27,13*	4,63	4,20		6	3,37	5,29
P2	31,33 ^a	31,33*	31,33*	22,93*	0,43	0,43		5	3,33	5,22
P3	30,90 ^a	30,90*	30,90*	22,50*				4	3,27	5,23
P4	8,40 ^b	8,40*	8,40*					3	3,18	5,00
P5	0 ^b	0						2	3,03	4,75
P6	0 ^b									

Keterangan : Superskrip * menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$)

$$se = \sqrt{\frac{KTS}{n}}$$

$$= \sqrt{\frac{17,23}{7}} = 1,57$$

Notasi



Kesimpulan :

Jumlah koloni *Brucella abortus* Strain 19 terbanyak dijumpai pada P0 (kontrol) yang tidak berbeda nyata dengan jumlah koloni pada P1, P2 dan P3. Jumlah koloni yang terendah, (dalam hal ini tidak ada pertumbuhan koloni sama sekali) dijumpai pada P5 dan P6 yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya kecuali dengan P4.